

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-154700

(43)Date of publication of application : 14.06.1990

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68  
C07H 21/04  
C12Q 1/04  
// C12Q 1/10  
G01N 33/569  
G01N 33/60

(21)Application number : 01-173882

(71)Applicant : IRE MEDGENIX SA

(22)Date of filing : 05.07.1989

(72)Inventor : MOUREAU PHILIPPE  
DERCLAYE ISABELLE  
DELOR ISABELLE  
CORNELIS GUY

(30)Priority

Priority number : 88 8809076 Priority date : 05.07.1988 Priority country : FR

(54) NUCLEIC ACID PROBE USEFUL FOR SPECIFIC DETECTION OF DIFFERENT BACTERIAL SPECIES OF GENUS CAMPYLOBACTER

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a probe for the specific detection of bacterial species belonging to the genus Campylobacter by preparing a DNA or RNA nucleic acid probe composed of a recognized characteristic sequence of DNA or RNA.

CONSTITUTION: This nucleic acid probe is a DNA or RNA nucleic acid probe composed of a recognized characteristic sequence of respective DNA or RNA sequence and useful for the specific detection of bacterial species of the genus Campylobacter. The selective detection and identification of the bacterial infection with Campylobacter coli or jejuni are carried out by using two kinds of probes having specificity to C.coli and C.jejuni, respectively, and separately forming hybrids with the complementary DNA sequence or the complementary RNA sequence belonging to the species to be identified and optionally modified when the sequence has a double-stranded structure in the initial state.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-154700

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)6月14日

C 12 Q 1/68  
C 07 H 21/04  
C 12 Q 1/04

ZNA A  
B

6807-4B  
7822-4C  
6807-4B※

審査請求 未請求 請求項の数 13 (全16頁)

⑭ 発明の名称 カンピロバクター属の異なる細菌種を特異的に検出するために有用な核酸プローブ

⑮ 特 願 平1-173882

⑯ 出 願 平1(1989)7月5日

優先権主張 ⑰ 1988年7月5日 ⑱ フランス(FR) ⑲ 8809076

⑳ 発 明 者 . フィリップ ムロー ベルギー国ショーモン-ギストウー、リュ、デ、セベンヌ、12

㉑ 出 願 人 イエルエ・マドジェニツクス、ソシエテ、アノニム ベルギー国フラーレス(番地なし)

㉒ 代 理 人 弁理士 佐藤 一雄 外2名  
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

カンピロバクター属の異なる細菌種を特異的に検出するために有用な核酸プローブ

2. 特許請求の範囲

1. 各々DNA又はRNA核酸の特徴的配列からなるDNA又はRNA核酸プローブであって、上記配列が標識されており、カンピロバクター属の細菌種の1つを特異的に検出するために有用であることを特徴とするプローブ。

2. カンピロバクター・コリ種に特異的な、請求項1に記載のプローブ。

3. カンピロバクター・ジェジュニ種に特異的な、請求項1に記載のプローブ。

4. 下記B267配列:

```

10      20      30      40      50
GATCAXCAGC AAAAXCAGCX XXXAAAYAX YAXXXAXACC AAXXXCCXXA
60      70      80      90      100
GCAXXGCGAA XXXGCACAGG AGXXCCGXGA ACCAAAGGAA AAXXGGCAGX
110     120     130     140     150
GAXXXCXXXA GCXXXXXXGG CAXXAXCAGG AGXAAAGGGA CGCAXGGAAA
160     170     180     190     200
CAACCAAXXC ACCGCXAAAA ACXCCXACAC XXXXGCAAGC AAXAXGGGXX
210     220     230     240     250
XXATACAXXG GCACAXXGCA XXXAXXGXAX AXAXGXGXAX XXXCXAGGCC
260
XXXXXCAAGX AAAGCXX
```

(DNA配列の場合 X = T ;

RNA配列の場合 X = U)

又は一方でX及びAかつ他方でC及びGを交換することによる相補的配列から誘導されるDNA又はRNA核酸配列を含む、請求項2に記載のプローブ。

5. 下記B81配列:

```

10      20      30      40      50
AAGCXXACGA XAXAAGCGAG XAXXAXAACG AXGAXXXGAX AGGXXXXXXA
60      70      80
CXGGGXXGXA GCXXXXCXXX XGAAGAAGCX X
```

## 特開平2-154700 (2)

(DNA配列の場合X = T ;

RNA配列の場合X = U)

又は一方でX及びAかつ他方でC及びGを交換することによる相補的配列から誘導されるDNA又はRNA核酸配列を含む、請求項2に記載のプロープ。

6. 下記B15・11配列:

```

10      20      30      40      50
AAGCTTCTTAA AAATGAGGTA GGGTGGAGTCTT TCTGCTTCTT TCGCTGATCTT
60      70      80      90      100
TGAATCTTCTT TCTTATGCTT TGAATCTTCTT AGGCTGCTGAG TCTTATATATCG
110     120     130     140     150
CAATCTTATAT TAGGATCTGCTT TGAATCTGCTT ATCTTATCTTCTT TCGCTTATCTT
160     170     180     190     200
AAAGATATCTT ATAGGCTGCTT TCTGCTTCTT TGAATCTTCTT ATCTTATCTTCTT
210     220     230     240     250
CATCTTATGCTT TCTTATATCTT ATCTTATCTTCTT TCTTATCTTCTT TCTTATCTTCTT
260     270     280     290     300
TCAATCTTCTT TCTTATCTTCTT TGAATCTTCTT TCTTATCTTCTT TCTTATCTTCTT
310     320     330     340     350
TCTTATCTTCTT TCTTATCTTCTT TGAATCTTCTT TCTTATCTTCTT TCTTATCTTCTT
360     370     380     390     400
CATCTTATGCTT TCTTATATCTT ATCTTATCTTCTT TCTTATCTTCTT TCTTATCTTCTT
410     420     430
TGAATCTTCTT TCTTATCTTCTT TGAATCTTCTT

```

又は一方でX及びAかつ他方でC及びGを交換することによる相補的配列を含む、請求項4又は7に記載のプロープ。

10. 配列GCC XXG ATC ATC XAA GGC ATC GAG

(DNA配列の場合X = T ;

RNA配列の場合X = U)

又は一方でX及びAかつ他方でC及びGを交換することによる相補的配列を含む、請求項6又は7に記載のプロープ。

11. カンピロバクター・コリ又はジェジュニ種の細菌感染の選択的検出及び同定方法であって、

請求項1に記載されたC<sub>1</sub>コリ及びC<sub>2</sub>ジェジュニに各々特異的な2種のプロープを、同定されるべき株に属する、最初二重鎖の場合に必要であれば変性された相補的DNA配列又は相補的RNA配列と別々にハイブリッド形成させることを特徴とする方法。

12. カンピロバクターにより示される

rDNA [その配列は下記:

(DNA配列の場合X = T ;

RNA配列の場合X = U)

又は一方でX及びAかつ他方でC及びGを交換することによる相補的配列から誘導されるDNA又はRNA核酸配列を含む、請求項3に記載のプロープ。

7. 請求項4～6のいずれか一項に記載された配列から誘導される15～35、好ましくは18～24ヌクレオチドの標識オリゴマー又は相補的オリゴマーにより構成される、請求項4～6のいずれか一項に記載のプロープ。

8. 配列CCX XXG GXX CAC GGA GXX CCX G

(DNA配列の場合X = T ;

RNA配列の場合X = U)

又は一方でX及びAかつ他方でC及びGを交換することによる相補的配列を含む、請求項4又は7に記載のプロープ。

9. 配列CCA XGC GXC CCX XXA GXC GXC AX

(DNA配列の場合X = T ;

RNA配列の場合X = U)

5'-XGA XCC GAC CGC AGG XGC XCC XA-3'

(X = T又はU)

又は相補的配列である]の制限多型性をサザンブロットにより分析することからなる“RFLP”法によってカンピロバクター属の細菌微生物の具体種を同定及び検出するための方法で有用な、請求項1に記載のプロープ。

13. 請求項12に記載されたプロープでの“RFLP”法によるカンピロバクター属の細菌微生物の具体種の同定及び検出方法であって、

1) 細菌の全DNAを酵素Bgl II又は2種の酵素Xho I及びBgl IIで消化し;

2) 得られたDNA断片をアガロースゲル電気泳動により分離し; しかる後

3) それらを変性し、ニトロセルロース又はナイロン膜上に移して固定し;

4) 上記膜からの上記断片とハイブリッド形成させるためにプロープを加える;

5) 検出されるプロープとハイブリッド形成された断片とそれらのサイズとの間の関係が下記の

## 特開平 2-154700 (3)

とおりである：

・カンピロバクター・ジェジュニは 0.4% ア  
ガロースゲル中で 3 つのバンドを示す：

・ 4.6 kb に近い 1 つ、及び

・更に大きなサイズの 2 つのバンド

・カンピロバクター・コリは通常約 0.8 kb の  
バンド及び場合により 2.4 kb のバンド又は  
3.6 kb のバンドを示す：

・カンピロバクター・ラリジスは約 2.4 kb の  
バンドを示す：

・カンピロバクター・フェツスは 6 kb に近い二  
重のバンドを示す：

・カンピロバクター・アップサリエンシスは  
0.830 kb 及び 2.4 kb に近い二つのバンドを示  
す：ことを特徴とする方法。

## 3. 発明の詳細な説明

## 発明の背景

本発明の技術分野は、標識された単一 DNA 又  
は RNA 核酸配列から構成されるプローブの分野

に関する。

DNA・DNA ハイブリッド形成は、分子生物  
学において必須の技術である。特に感染症の診断  
分野におけるヒトの健康に関してその可能性のあ  
る産業的用途は、広く認識されている。この具体  
的適用分野において、その方法は特異的同定手段  
として DNA プローブ、即ち所定微生物に特異的  
な標識 DNA 断片の使用に依存している。

多くの微生物に関して現在医学的ルーチンで常  
用されている同定方法は、ある生化学試験に関連  
した“特異的な”培地中での培養に基づいている。  
これらの方法では普通数日後になってやっと応答  
が得られ、しかも時々特異性の欠如によって役に  
立たなくされることがある。これは、先進国にお  
いて急性細菌胃腸炎の主要原因をなすカンピロバク  
ター (Campylobacter) (ジェジュニ (jejun)、  
コリ (coli)) の場合に特にあてはまる。

したがって、微生物検出のための DNA・  
DNA ハイブリッド形成技術の選択は、胃腸炎の  
原因であるカンピロバクター株のような病原体の

糞又は食品中での同定のために優先して行われる。

## 発明の一般的説明

本発明は、カンピロバクター属 (以下、C. と  
略記される) の細菌微生物の検出及び同定のため  
の核酸プローブに関する。

更に正確には、本発明は、カンピロバクター属  
の様々な細菌種を特異的に検出及び同定するため  
に有用な、各々標識された DNA 又は RNA の特  
定配列からなる DNA 又は RNA 核酸プローブに  
関する。特に、本発明はカンピロバクター・コリ  
種の特異的プローブ及びカンピロバクター・ジェ  
ジュニ種の他の特異的プローブに関する。

事実、腸炎の原因であるカンピロバクター種  
の中で、カンピロバクター・ジェジュニ及びカンピ  
ロバクター・コリは合わせてそのケースの 99%  
を占め、一方 C. ラリジス (C. laridis) 及び C.  
フェツス (C. fetus) はそのケースのわずか 1% を  
占めるだけである。C. コリに対する C. ジェ  
ジュニの比率は、80/20 ~ 50/50 の割合で  
国毎に異なる。

このように、本発明はカンピロバクター・コリ  
種の特異的プローブに関し、それは下記 B 267

配列：

```

      10      20      30      40      50
GATCAGCAGC AAAACAGGCG XXXAAATATX YATATATACC AATXXCCXXA
      60      70      80      90     100
GCATXXGCCAA XXXGCACAGG AGCXXCCGXA ACCAAAGGAA AATXXGCCAGX
      110     120     130     140     150
GATXXCXXAA GCXCCXXCGG CAXXATCAGG AGXAAAGGGA CGCATGGAAA
      160     170     180     190     200
CAACCAXXXC ACCGCGXAAA ACXCCXACAC XXXXGCAAGC AATXXCGGXX
      210     220     230     240     250
XXATACATCG GCACATXXGA XXXXXGGA AXATGXCYXA XXXCXAAGCC
      260
XXXXCAAGX AAAGCXX

```

(DNA 配列の場合 X = T；

RNA 配列の場合 X = U)

又は一方で X 及び A かつ他方で C 及び G を交換す  
ることによる逆相補的配列から誘導される DNA  
又は RNA 核酸配列を含むことを特徴とする。

プローブの好ましい態様において、それらは上  
記配列 B 267 から誘導される 15 ~ 35、好ま  
しくは 18 ~ 24 ヌクレオチドの標識オリゴマー

## 特開平 2-154700 (4)

又は相補的オリゴマーから構成される。特に、下記配列が挙げられる：

CCX XXG GXX CAC GGA GCX CCX G  
CCA XGC GXC CCX XXA CXG CXG AX

同様に、本発明はカンピロバクター・コリ種の特異的プローブとして下記 B 8 1 配列：

10 20 30 40 50  
AAGCXXACGA XAXAAGCGAG XAXXAXAAG AXGAXXXGAX AGGXCCCCA  
60 70 80  
CXGGGXGGA GCXXXXXX XGAAGAAACX Y

(DNA 配列の場合 X = T；

RNA 配列の場合 X = U)

又は一方で X 及び A かつ他方で C 及び G を交換することによる相補的配列から誘導される DNA 又は RNA 配列を含む核酸配列に関する。

有利には、これらのプローブは上記配列 B 8 1 から誘導される 15～35、好ましくは 18～24 ヌクレオチドの標識オリゴマー又は相補的オリゴマーから構成される。

本発明はカンピロバクター・ジェジュニ種の特

異的プローブに関し、それは下記 15・11 配列：

10 20 30 40 50  
AAGCXXXXA AAAXGAGGYA GGGXXGAXXX XCGXXAXXX XCGCXGAXXX  
60 70 80 90 100  
XGAXXXAGG XXXXAXGCCX XGAXCXCA AGGCXGCGAG XXXAXAAGC  
110 120 130 140 150  
CAACXAAAAA XAGGAXCGCX XGAAGCAGXG AXCAAXCXXX GGCXACACCC  
160 170 180 190 200  
AAAGAXAXCA AXAGGXGCA XXGXXCXXX GAGXXXXXA AXACXGCAXX  
210 220 230 240 250  
CAACAAGGCC GXXAGAAACX AXGAXXXAC XXXXXGAAAG XCCXGXXGA  
260 270 280 290 300  
ICAAGXXCX GXCXGAXXX CAAACXCAC XAAGXAAAX XXCCAGAAAC  
310 320 330 340 350  
XAXXCGACA CCGCCXXCX GGAACCAAA XXXXXXXA ACXXAXXCG  
360 370 380 390 400  
CAXXXXAAG XCGCXAXXX AGACAAXCAX AAGXAXCGAX CAAAAAACA  
410 420 430  
GGAXXXXXX GAXAAXXXX CACAXAAGCX X

(DNA 配列の場合 X = T；

RNA 配列の場合 X = U)

又は一方で X 及び A かつ他方で C 及び G を交換することによる相補的配列から誘導される DNA 又は RNA 核酸配列を含むことを特徴とする。

好ましい態様において、本プローブは上記 15・11 配列から誘導される 15～35、好ましくは 18～24 ヌクレオチドの標識オリゴマー又は相補的オリゴマーから構成される。特に、下記配列が挙げられる：

GCC XXG AXG XGC XAA GGC XGC GAG

したがって、カンピロバクター・コリプローブに関して 2 種 (B 2 6 7 及び B 8 1 から誘導される) 及びカンピロバクター・ジェジュニプローブに関して 1 種 (15・11 から誘導される) が選択された。これらのプローブによれば、コロニーハイブリッド形成、スポット上でのドットハイブリッド形成及び“サザン”ハイブリッド形成により、カンピロバクター・コリをカンピロバクター・ジェジュニから区別することができる。

サザンプロットハイブリッド形成により、150 の異なるカンピロバクター株の DNA に対するこれらプローブの特異性及び感度が確認された。

核酸プローブは現状技術で周知であって、様々

なルート、特に遺伝子工学又は直接的マニュアルもしくは自動合成によって得られる。

これらの核酸配列は、最初二重鎖である場合に必要であれば変性された相補的 DNA 又は RNA 配列と関連する及びそれとハイブリッドを形成する性質を有している。この変性は、塩基性培地中のインキュベート、培地温度の上昇、これら 2 プロセスの組合せ又は再度マイクロ波の作用によって行うことができる。

ハイブリッドの検出は、様々な方法によって行うことができる。本プローブは、核酸プローブの標識に関して当業者に公知の方法の 1 つによって標識される。例えばリン 32 で放射性同位元素標識されるか又はコールド (cold) プローブの場合には例えば酵素で非放射性同位元素標識されるが、これも公知である。あるケースでは、プローブは酵素で標識されないが、但し例えばハイブリッド形成後に存在可能なビオチンで化学的に修飾される。

したがって、本発明の目的は、カンピロバクタ

## 特開平2-154700(5)

ー・コリ又はジェジュニ種の微生物のDNA又はRNAとのハイブリッド形成による上記種の細菌感染の選択的検出及び同定方法を提供することにもあるが、その場合においてC. コリ及びC. ジェジュニに各々特異的な本発明の2つのプローブが最初二重鎖である場合に必要であれば予め変性された同定されるべき株に属する相補的DNA又はRNA配列とハイブリッド形成されることを特徴とする。

最後に、本発明は、カンピロバクターにより示されるrDNA(リボソームRNAについてコードするDNA)の制限断片鎖多型性のサザンブロット法による分析からなる“RFLP法”によってカンピロバクター属の細菌微生物の具体種を同定及び特徴化するための方法で有用なプローブに関し、そのDNA配列が下記:

5'-XCA XCC GAC CGC AGG XXC XCC XA-3'

(X=T又はU)

又はその逆相補的配列であることを特徴とする。

特に適切なプローブでの“RFLP法”による

カンピロバクター属の細菌微生物の具体種の同定及び特徴化方法は、以下のとおりであることを特徴とする:

1) 細菌の全DNAは酵素Bgl II又は2種の酵素Xho I及びBgl IIで消化される;

2) 得られたDNA断片はアガロースゲル電気泳動により分離される; しかる後

3) 変性し、ニトロセルロース又はナイロン膜上に移して固定する;

4) プローブが上記膜上の上記断片とハイブリッド形成させるために加えられる;

5) 検出されるプローブとハイブリッド形成される断片とそれらのサイズとの間の関係は下記のとおりである:

・カンピロバクター・ジェジュニは0.4%アガロースゲル中で3つのバンドを示す:

・4.6 kbに近い1つ、及び

・更に大きなサイズの2つのバンド

・カンピロバクター・コリは通常約0.8 kbのバンド及び場合により2.4 kbのバンド又は

3.6 kbのバンドを示す:

・カンピロバクター・ラリジスは約2.4 kbのバンドを示す:

・カンピロバクター・フェツスは6 kbに近い二重のバンドを示す:

・カンピロバクター・アップサリエンシス(C. upsaliensis)は0.830 kb及び2.4 kbに近い二つのバンドを示す。

本発明のプローブは、C. ジェジュニ及びC. コリ種に特徴的なオリゴヌクレオチドプローブである。文献に記載されたカンピロバクタープローブと比較した場合のこれらプローブの主な特徴は、2つの主なカンピロバクター種(99%): C. ジェジュニ及びC. コリの間で識別しうるそれらの能力である。最良のケースでも非常に遅くかつわずか85%の信頼度である従来の生化学試験と比べて、これらのプローブによれば迅速かつ正確な同定が可能である。

本発明によるプローブの特異性及び感度は、約150のカンピロバクター株及び約100種の共

生相に関して試験された。文献に現れるC. ジェジュニプローブはいずれも、多数のカンピロバクター株又は共生相種に関して試験されていなかった。文献に記載されたカンピロバクター・ジェジュニプローブは染色体DNA断片であるが、一方本発明のプローブは特定のオリゴヌクレオチドである。

医学的観点から、C. ジェジュニ及びC. コリ間の病原性の差異は明確に同定されなかった。更に正確には、この目的で行われた2つの疫学的研究では矛盾した結果が得られた[ザ・ランセット(The Lancet), 1988年1月23日, 第176・77頁; ザ・ランセット, 1988年4月23日, 第942・43頁]。この欠点は、従来の生化学試験(馬尿酸の加水分解試験)の結果の信頼性欠如及び解釈の困難性におそらく基づくのであろう。

したがって、本発明は、生物学的試料中におけるC. ジェジュニ及びC. コリの選択的同定を可能にする手段(C. ジェジュニ及びC. コリオリ

## 特開平2-154700(6)

ゴヌクレオチドプローブ)、並びに異なるカンピロバクター種の迅速かつ信頼しうる同定を可能にするカンピロバクター株の分類方法(rDNAプローブによるRFLP技術)を提供する。

これらの手段及び方法は、異なるカンピロバクター種間の病原性の差異を臨床医が明らかにすることができねばならず、ひいてはそれによって病原であるカンピロバクター種の関数として彼らが要治療性(therapeutic sanction)を示すことができねばならない。

欧州特許出願第232,085号明細書は、rRNAとハイブリッド形成しかつカンピロバクター属に特異的であるが但しカンピロバクター種を同定しえないプローブについて記載している。

国際特許WO第86/4422号明細書は、非特徴化(非配列決定)染色体DNA断片であるプローブについて記載している。これらのプローブはカンピロバクター種に特異的でなく、しかもわずか80%の感度でしかない。

文献中に記載されたプローブ:カンピロバク

ター・ジェジュニ同定用の特異的DNAプローブ(V.コーリック(V.Korlik)ら、ジャーナル・オブ・ゼネラル・マイクロバイオロジー(Journal of General Microbiology),1988年,第134巻,第2号,第521-9頁)はC.ジェジュニに特異的でない。事実、苛酷なハイブリッド形成条件下であっても、あるC.コリはこのプローブとハイブリッド形成する(第3a図、4及び5列)。多数の共生相種と比較したこのプローブの特異性は、確認されていない。

文献中に記載されたプローブ(C.ジェジュニに関する種特異的DNAプローブの分子クローニング、P.ビケン(P.Picken)ら;モレキュラー・アンド・セルラー・プローブ(Molecular and Cellular Probes),1987年,第1巻,第3号,第245-59頁)は、最少で1kbの染色体DNA断片である。これらプローブの配列は非公知である。これらのプローブの特異性は確認されていない。

“ゲノムDNAのサザンハイブリッド形成によ

るカンピロバクター種の同定”,ロマニウク(Romanuk)ら、FEMSマイクロバイオロジカル・レターズ(FEMS Microbiological Letters),1987年,第43巻,第3号,第331-5頁に記載されたロマニウクにより用いられているRFLP法は、カンピロバクターに“特異的な”rRNAプローブに基づいている。用いられたプローブの配列は、本発明のプローブと異なる。

本発明のRFLP法に用いられるプローブの配列は、大腸菌(*Escherichia coli*)の配列から誘導される。したがって、このプローブはカンピロバクタータイプに特異的でないが、但しその性質(大腸菌及びカンピロバクター・ジェジュニに共通して保存された配列)からそれは非常に高感度である( $n=150$ に関して感度100%)。このプローブは、カンピロバクター(ジェジュニ、コリ、ラリジス、フェツス、アップシアレンシス)の具体種の同定を上記種のrDNAのXhoI・BglII RFLPの分析によって可能にする。

この論文に記載されたロマニウクの方法では、

C.コリ及びジェジュニ間の識別が通常不可能である(第1C図、1及び6列)。

記載されたプローブは全体的に異なるデザインであって、用いられた制限酵素は異なりかつ制限特性も異なる。

本発明の他の利点及び特徴は、下記記載から明らかとなるであろう。

下記記載は、添付図面の第1~6図を参考にしなされている。

第1~3図は、カンピロバクターの外膜タンパク質の特性に関するポリアクリルアミドゲル分折について示している。それは、カンピロバクターから得られる外膜タンパク質(OMP)のSDS-PAGE電気泳動(クマシーブルーで染色,14~20%勾配)に関する。各列下の数値は、株を示す。カラムM:キロドルトンによるタンパク質の標準分子量。CcはC.コリに特徴的なOMPタンパク質を示す。CjはC.ジェジュニに特徴的なOMPタンパク質を示す。

第4図は、酵素XhoI/BglIIで開裂され



特開平2-154700(7)

かつ下記配列:

5'-TGA TCC GAC CGC AGG TTC TCC TA-3'

の16S rDNAに相補的なプローブとハイブリッド形成されたカンピロバクターのゲノムDNAの“サザンプロット”による分析結果について示している。パネルA:カンピロバクター・コリ(株No108、212、80、82、85、87、89、90)、カンピロバクター・ジェジュニ(株No106、83、84、96、8、95、2、3、88)、カンピロバクター・フェツス(株No1)及びカンピロバクター・ラリジス(株No116)のDNAが組合せ酵素XhoI・BglIIで消化された。写真上の数値は様々な株に対応する。DNA断片はナイロン膜に移された。膜は<sup>32</sup>Pで標識されたrDNAプローブとハイブリッド形成された。分子量標準はスファージのHindIII消化である(列M:写真横の数値は分子量参照の断片のサイズに相当する)。パネルB:参照株のDNAは酵素XhoI及びBglIIで消化され、パネルAで記載されているように分析さ

れた。

M B L G 株

2 C. ジェジュニ  
3 C. ジェジュニ  
8 C. ジェジュニ  
46 C. ジェジュニ  
83 C. ジェジュニ  
84 C. ジェジュニ  
88 C. ジェジュニ  
95 C. ジェジュニ  
96 C. ジェジュニ  
203 C. ジェジュニ  
9 C. コリ  
80 C. コリ  
82 C. コリ  
85 C. コリ  
87 C. コリ  
89 C. コリ  
90 C. コリ

参照株

1 C. フェツス  
106 C. ジェジュニリオール(Lior)4  
208 C. ジェジュニNCTC11848  
108 C. コリ リオール1  
211 C. コリ リオール44  
212 C. コリ リオール8  
116 C. ラリジス リオール34  
195 C. ラリジスNCTC11352  
170 C. アップサリエンスNCTC11541  
(MBLG:ルヴェンのカトリック大学における微生物研究所の略)

第5及び6図は、カンピロバクターのゲノムDNAのサザン分析結果について示している。

第5図: 酵素HindIIIで消化されかつプローブ15-11とハイブリッド形成されたカンピロバクターのゲノムDNA分析

第6図: 酵素HindIII/Sau3Aで消化されかつプローブB267とハイブリッド形成されたカンピロバクターのゲノムDNA分析

好ましい態様の説明

下記態様は例示であって、限定のためと解釈されるべきではない。

例1: 株の分類

本発明の第一ステップは、カンピロバクターコレクションの確立及び後者の株の分類であった。これらのステップは、後に単離されたプローブの特异性及び選択性の決定のために不可欠であった。

従来の細菌学において、C. コリ及びC. ジェジュニの識別は馬尿酸試験の加水分解に唯一基づいている。現在この生化学試験は、最良の場合でもわずか85%の信頼度であると通常認識されている。したがって、株の分類のために2つの異なるアプローチに従うことが決定された: 1) 第一は異なる種の全DNA間の相関率に基づく; 2) 第二はカンピロバクター外膜のタンパク質の特性に関するポリアクリルアミドゲル分析である(第1~3図参照)(外膜タンパク質のSDS-PAGE)。

これら2つの方法から得られた結果(下記第1

## 特開平2-154700(8)

表)は、分析された25の株について完全に一致している。

第1～3図において、下記株が用いられている：

第1図：116 C, ラリジス I リオール34

1 C, フェツス

108 C, コリ リオール1

106 C, ジェジュニ1リオール4

46 研究所で単離された株

90 ベルギー, ブラッセルのセントラック

クリニックで単離された株

第2図：3-8-83-84-88-92-95-2-55-78-79-81-86-

96:ベルギー, ブラッセルのセントラック

クリニックで単離された株

第3図：9-80-82-85-87-89-90 及び108:ベルギー,

ブラッセルのセントラッククリニック

で単離された株

第1～3図の分析では、各々Cj OMP55

(分子量55kDa)、Cj OMP37(分子量

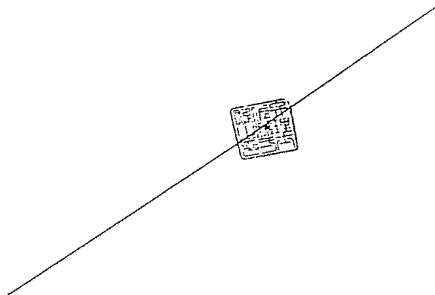
37kDa)、Cc OMP84(分子量84kDa)及

びCc OMP37(分子量25kDa)と命名され

たカンピロバクター・ジェジュニの2種の特異的タンパク質及びカンピロバクター・コリの2種の特異的タンパク質の存在について示している。したがって、これら4種のタンパク質は、C, コリ及びC, ジェジュニのこれら4種の特異的タンパク質に対する循環抗体を調べるために、これらタンパク質の特異的抗体の使用、これらのタンパク質に相当する合成ペプチドの使用又はこれらタンパク質についてコードする遺伝子もしくはmRNAに特異的なDNA/RNAプローブの使用のいずれかに基づきカンピロバクターを分類する診断試験の確立のために役立つ。

これら25の株は、rDNA(リボソームRNAについてコードするDNA)のRFLP(XhoI-BglII)に基づくカンピロバクターの同定方法の開発のための参照株として機能した。カンピロバクターのrDNAの高度に保存された領域とハイブリッド形成する配列5'-TGA TCC GAC CGC AGG TTC TCC TA-3'のオリゴヌクレオチドをプローブとして用いることにより、この方法

はサザンブロットによるこの属の様々な種の同定を可能にする。我々のコレクションの150株は、この方法により同定された。これら同一の150株は、本発明によるカンピロバクター用のプローブ(プローブ"B267"及び"15-11")の特異性及び選択性の決定のために用いられた。しかもこの研究結果は、C, コリ種が想定された従来の試験の場合よりもベルギーにおいて(約16%)良好に確認されうること示している。



第1表：馬尿様の加水分解試験、OMP特性及び全DNAの相同率によるカンピロバクター・ジェジュニ及びカンピロバクター・コリの同定

参照株	馬尿様の加水分解	OMP特性	下記株との相同率	
			C, ジェジュニ1リオール4	C, コリ1リオール1
1 C, フェツス	n.a.	F	2%	5%
106 C, ジェジュニ1リオール4	+	J	100%(H)	34%
208 C, ジェジュニNCTC11848	n.i.	n.i.	65%	27%
108 C, コリ リオール1	-	C	31%	100%(H)
211 C, コリ リオール44	-	C	29%	80%
212 C, コリ リオール8	-	C	38%	97%
116 C, ラリジス リオール34	n.a.	n.a.	14%	10%
195 C, ラリジスNCTC11352	n.a.	n.a.	22%	11%

特開平2-154700 (9)

試験された株	2	+	J	115%	21%
	3	-	J	100%	36%
	8	+	J	79%	28%
	9	n.i.	C	47%	92%
	46	+	J	104%	28%
	80	n.i.	C	32%	69%
	82	n.i.	C	43%	95%
	83	n.i.	J	107%	35%
	84	+	J	77%	31%
	85	n.i.	C	38%	83%
	87	n.i.	C	41%	91%
	88	+	J	77%	34%
	89	-	C	38%	79%
	90	-	C	43%	90%
	95	+	J	125%	46%
	96	n.i.	J	94%	39%
	203	n.i.	J	109%	33%
J=カンビロバクター・ジェンシエニ C=カンビロバクター・コリ F=カンビロバクター・フェツス n.i.=同定不能 n.i.=試験せず n.a.=適用せず OMP=外膜タンパク質 R=相同決定のため に用いられた参照株					

%v/v β-メルカプトエタノール、41%ドデシル硫酸ナトリウム、15%v/v グリセロール、0.01%プロモフェノールブルー) 200μl中に回収されたOMP (ペレット) を保存のため-20℃に凍結するか、又は変性用培地の勾配(14~20%)中垂直ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析(SDS-PAGE, アクリルアミド・ビスアクリルアミド29:1, 0.4% SDS)のために沸騰水浴中で5分間浸漬する。

分析容量は30μlであって、移動は15mAの一定電流下で16時間行われた。タンパク質をクマシーブルーで染色することにより展開した。

#### 例1B

##### rDNAの制限多型性(RFLP)に基づくカンビロバクターの分類技術に関する説明

全DNA(1~2μg)を制限緩衝液(37.5mMトリスHCl、9.5mM MgCl<sub>2</sub>、1.25mM DTT、125mM NaCl、225μg/ml BSA; pH7.5)40μl中37℃で8~16時間にわたり各々

#### 例1A

##### カンビロバクターの外膜タンパク質(OMP)の調製及び分析

微好気性雰囲気下[ガスパック・アナエロカルトCメルク(Caspak anaerocult C Merck)]37℃で48時間の培養後、細菌をpH7の0.001Mリン酸緩衝液中に再懸濁する。それらの濃度を10CFU/mlに調整する(CFU=コロニー形成単位)。

これらの懸濁液を超音波で2分間破壊処理し[超音波処理器ブランソンB12(Branson B12)],しかる後アリコート3ml当たり5000gで20分間遠心分離する。懸濁液を33,000gで90分間再度遠心分離する。ペレットをラウリルサルコシン酸ナトリウム2%含有のpH7の0.001Mリン酸緩衝液2倍容量と再懸濁後追加の蒸留水0.5mlに再懸濁する。室温で30分間攪拌(150rpm)後、この混合物を33,000gで90分間遠心分離する。サンプル緩衝液(pH6.8の50mMトリスHCl、5

20単位の制限酵素XhoI及びBglIIと共にインキュベートした。反応をフィコール(Ficoll)[ファルマシア(Pharmacia)]30%及びプロモフェノールブルー0.25%含有10×TBE(1×TBE=0.05MトリスHCl、0.05Mホウ酸、0.001MEDTA;pH8.3)5μlの添加により停止させた。DNA断片を臭化エチジウム1μg/ml含有1×TBE中0.8%アガロースゲル[シーケム(Seakem);FMC]上で分離した。臭化エチジウム0.1μg/ml含有1×TBE中25mAで16時間電気泳動後、DNAを脱プリン化するためゲルを0.25N HCl浴中に15分間浸漬した。次いで、ゲルを0.5M NaOH・1.5M NaClに30分間及び0.5MトリスHCl(pH7.5)・1.5M NaClに30分間連続的に浸漬した。移動用緩衝液として10×SSC(1.5M NaCl、0.15Mクエン酸三ナトリウム)を用いることにより、DNA断片をゲルからナイロン膜[ハイボンド-N

## 特開平2-154700 (10)

(Hybond-N) ; アマーシャム (Amersham) に移した。膜を  $2 \times \text{SSC}$  で15分間洗浄し、1分間乾燥し、DNAをUV (312nm) 照射により膜に固定した。

次いで、膜を粉乳1% [ネスル (Nestle) のグロリア (Gloria)]、SDS 2% (ドデシル硫酸ナトリウム) 及び牛胸腺由来変性DNA [サーバ (Serva)]  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$  含有  $6 \times \text{SSC}$  中50℃で2時間前ハイブリッド形成させた。次いで、膜をプローブ ORJ 16 Sa 10<sup>6</sup> dpm/ml 含有の同一緩衝液 ( $25 \mu\text{l}/\text{cd}$ ) 中でハイブリッド形成させた。プローブの末端標識化は、ワレス (Wallace) の方法に従い基質として  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP を用い T4 キナーゼで行われた。

50℃で16時間インキュベート後、膜を50℃において  $2 \times \text{SSC} - \text{SDS}$  1% 緩衝液で15分間にわたり3回洗浄した。

膜を風乾し、-80℃で16~48時間にわたり塩化スクリーンでオートラジオグラフィに付した [マニアティス (Maniatis) ら、1982年]。

本発明によれば、各々の種の特異的クローンの単離を示差的ハイブリッド形成により可能にするプロトコールが完成された。我々のプロトコールによれば、ゲノムバンクの各クローンの3つのコピーを、C. コリ、C. ジェジュニ及びC. ラリジスの全DNAと各々ハイブリッド形成させた。各バンクについて、相対的全DNA (即ち、それらが由来するDNA) とハイブリッド形成するが他の2つの非相同種の全DNAとハイブリッド形成しないクローンが得られた。これらクローンの各々のプラスミドDNAを精製し、上記のように再試験した。これら2つのスクリーニングステップで選択されたクローンを、例1で記載のように特徴付けられる25のカンピロバクター株からの全DNAとハイブリッド形成させた。この試験で最も選択的かつ最も特異的なクローン (本発明では15・11、B267及びB81と呼ばれる) は、ハイブリッド形成コロニーによる4回目のスクリーニングで得られた。25のカンピロバクター株をカンピロバクターについて選択的な培地に

## 例2: プローブ源

DNA源はカンピロバクターのゲノムDNAであった。C. ジェジュニ及びC. コリ株からの全DNAをSau3A制限酵素で部分的に開裂し、約4kbのDNA断片を得た。C. ジェジュニの異なる制限断片をベクターpBR322でクローニングし、C. コリの断片をベクターpUC9でクローニングし、各々の種のゲノムバンクを得た。C. コリ及びC. ジェジュニプローブをこれらのバンクから単離した。

## 例3: プローブの選択基準

プローブの質の評価を可能にする2つの基準が存在する: 特異性及び選択性。プローブが種に特異的である場合には、特異性とはこの種に属する株のDNA (又はRNA) とのみハイブリッド形成するこのプローブの性質をいう。このようなプローブの選択性とは、この種のすべての株のDNA (又はRNA) とハイブリッド形成するこのプローブの能力をいう。

## 例4: ゲノムバンクのスクリーニング

置かれた2種のナイロン膜 (アマーシャムのハイボンド・N) 上で培養した。製作者の助めに従う膜の培養及び処理の後、1種の膜はプローブB267とハイブリッド形成し、他はプローブ15・11とハイブリッド形成した。

C. コリ又はC. ジェジュニとして分類されたすべての株は、各々B267又は15・11と更に強くハイブリッド形成した。C. フェツス又はC. ラリジスとして分類された株は、2つのプローブと更に弱くかつ同一にハイブリッド形成した。

## 例5: プローブの特異性及び感度の測定

プローブの特異性及び感度の試験は、コロニー上のハイブリッド形成又はスポット上のドットハイブリッド形成のいずれかで通常行われる。最初のケースでは、プローブはDNAを精製することなく多数の株とハイブリッド形成される。株のDNAが精製される場合には、特異性及び感度に関する試験はドットハイブリッド形成又は“サザンブロット”により行うことができる。

プローブB267又は15・11の特異性 (カ

## 特開平2-154700(11)

ンビロバクター属に属する)及び感度の試験は、カンビロバクターの制限多型性のサザンプロットによる分析に依存している。この技術は、プローブの感度を確認しうる能力以外にも、分析される各株に関してプローブとハイブリッド形成するゲノムDNAの1以上の断片のサイズを示すことによりその特異性を強調する特徴を有している。

プローブB267又は15・11の特異性に関する試験は、既に分類された150のカンビロバクター株からのゲノムDNAのサザンハイブリッド形成により行われた。

プローブの場合と等しいサイズ(第5図)のHindⅢ断片レベルですべてのC. ジェジュニ株のDNAとハイブリッド形成するC. ジェジュニプローブ(クローン15・11から得られる431bpのHindⅢ断片)がこうして選択された。このプローブは、他の種の株のDNAとハイブリッド形成しない。C. ジェジュニ種に属するこのプローブに関して制限多型性(制限断片長さ多型性)は存在しないようである。これは、我々

のプローブがC. ジェジュニ種の特異的な保存領域を認識しうることを示している。

第5図で再現された実験の場合、カンビロバクター・コリ(株211及び108)、カンビロバクター・ラリジス(株195及び116)、カンビロバクター・フェツス(株1)及びカンビロバクター・ジェジュニ(株208～2;カラム7～18)のDNA2μgをHindⅢで消化した。C. ジェジュニの特異的プローブをビオチン化させた。HindⅢで消化されたλDNAを分子量マーカーとして用いる(カラムM)。HindⅢで消化された非標識ベクター・プローブを陽性コントロールとして用いた(カラムC)。

C. ジェジュニプローブと同一の特異的特性を有する2つのC. コリプローブも単離された。それらは81bpのHindⅢ断片(プローブB81)及び267bpのHindⅢ・Sau3A(プローブB267)からなる。後者は、267bpのHindⅢ・Sau3A断片レベルですべてのC. コリ株のDNAとハイブリッド形成する。このプ

ローブは、他の種の株のDNAとハイブリッド形成しない(第6図)。

第6図で示された実験の場合、カンビロバクター・コリ(株89、82、90、80、212、211及び108)、カンビロバクター・フェツス(株1)、カンビロバクター・ラリジス(株116)及びカンビロバクター・ジェジュニ(株96、95、208)のDNA2μgをHindⅢ・Sau3Aで消化した。C. コリの特異的プローブ(B267)をビオチン化させた。HindⅢで消化されたλDNAを分子量マーカーとして用いた(カラムM)。非標識電気泳出プローブ(100pg)を陽性コントロールとして用いた(カラムC<sup>+</sup>)。

C. コリプローブB81の特異性及び感度も確認された。

## 例6: サブクローニング及び配列決定

選択されたプローブを1本鎖ファージベクターM13でサブクローニングし、ヌクレオチド配列を決定した。

## 例7: プローブの特異性及び感度の測定

OCC267a及びOCC267bと呼ばれるプローブB267に相当する2つのオリゴヌクレオチド並びにプローブ15・11に相当するオリゴヌクレオチド(OCCJ1511aと呼ばれる)を合成し、スポット上のドットハイブリッド形成及びコロニーハイブリッド形成に関して試験した。115のカンビロバクター株(C. ジェジュニ96及びC. コリ19)とこれらプローブとのドットハイブリッド形成及びコロニーハイブリッド形成に基づく特異性及び感度の計算結果は、下記表でまとめられている:

	特異性	感度
OCC267a	97%	100%
OCC267b	97%	95%
OCCJ1511a	95%	100%
OCC267a		
配列: 5'>CCT TTG GTT CAC GGA GCT CCT G<3'		
22塩基		
OCC267b		

## 特開平 2-154700 (12)

配列 : 5'->CCA TGC GTC CCT TTA CTC CTG AT<3'

## 2 3 塩基

O C J 1 5 1 1 a

配列 : 5'->GCC TTG ATC TTC TAA GGC TGC GAG<3'

## 2 4 塩基

これらのオリゴヌクレオチドは、下記市販株の株とハイブリッド形成しない。下記株はコロニーハイブリッド形成により試験された：

セラチア・リクエファシエンス(*Serratia liquefaciens*)  
 セラチア・マルセッセンス(*Serratia marcescens*)  
 エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)  
 エドワードシエラ(*Edwardsiella*)  
 クレブシエラ・オキシトカ(*Klebsiella oxytoca*)  
 クレブシエラ・ニューモニアエ(*Klebsiella pneumoniae*)  
 クレブシエラ・アエロゲネス(*Klebsiella aerogenes*)  
 シゲラ・フレクスネリ(*Shigella flexneri*)  
 シゲラ・ソネイ(*Shigella sonnei*)  
 シゲラ・ジセンテリアエ(*Shigella dysenteriae*)  
 シゲラ・フレクスネリ 1 (*Shigella flexneri* 1)  
 シゲラ・フレクスネリ 1 a  
 シゲラ・フレクスネリ 2 a  
 シゲラ・フレクスネリ 4 a  
 シゲラ・フレクスネリ 6  
 シゲラ・ボイジイ 1 (*Shigella boydii* 1)  
 シゲラ・ボイジイ 2  
 シゲラ・ボイジイ 1 4  
 シゲラ・ジセンテリアエ 2 (*Shigella dysenteriae* 2)  
 シゲラ・ジセンテリアエ 3

## 1. 腸内細菌

エンテロバクター・アエロゲネス(*Enterobacter aerogenes*)  
 エンテロバクター・アグロメランス(*Enterobacter agglomerans*)  
 エンテロバクター・クロアカエ(*Enterobacter cloacae*)  
 ハフニア・アルベイ(*Hafnia alvei*)  
 アルカレスセンス・ジスパー(*Alcalescens dispar*)  
 サルモネラ・チフィー(*Salmonella typhi*)  
 サルモネラ・バラ・チフィー A (*Salmonella para typhi* A)  
 サルモネラ・バラ・チフィー B (*Salmonella para typhi* B)  
 サルモネラ・インファンチス C (*Salmonella infantis* C)  
 サルモネラ・エンテリチジス D (*Salmonella enteritidis* D)  
 プロテウス・ブルガリス(*Proteus vulgaris*)  
 プロテウス・ミラビリス(*Proteus mirabilis*)  
 プロテウス・モルガニイ(*Proteus morganii*)  
 シトロバクター・フレウンジイ(*Citrobacter freundii*)  
 シトロバクター・アマロナチクス(2) (*Citrobacter amalonaticus*(2))  
 シトロバクター・ジベルサス(*Citrobacter diversus*)  
 プロビデンシア・レットゲリ(*Providencia rettgeri*)  
 プロビデンシア・アルカリファシエンス(*Providencia alcalifaciens*)  
 プロビデンシア・スツアルティイ(*Providencia stuartii*)

イエルシニア・エンテロコリチカ Y22703(*Yersinia enterocolitica* Y22703)  
 イエルシニア・エンテロコリチカ E439:80 CaD 0:9  
 イエルシニア・エンテロコリチカ E439:80 CaI 0:9  
 イエルシニア・エンテロコリチカ 708-82 CaD 0:5.27  
 イエルシニア・エンテロコリチカ Y22708 CaD 0:9  
 イエルシニア・エンテロコリチカ Y22708 CaI 0:9  
 イエルシニア・エンテロコリチカ Y836 CaD 0:5.27  
 イエルシニア・エンテロコリチカ E104/81 CaI 0:10  
 イエルシニア・エンテロコリチカ Y845 CaD 0:3  
 イエルシニア・エンテロコリチカ IP38 CaD 0:2  
 イエルシニア・エンテロコリチカ T1758 CaD 0:5  
 イエルシニア・エンテロコリチカ J35 CaI 0:5  
 イエルシニア・エンテロコリチカ E334/80 CaI 0:6.30  
 イエルシニア・エンテロコリチカ Y852 CaI 0:47  
 イエルシニア・エンテロコリチカ IP106 CaI 0:7.8  
 イエルシニア・エンテロコリチカ E301-82 CaI 0:41

## 2. 嫌気性菌

クロストリジウム・ジフィシル(*Clostridium difficile*)  
 クロストリジウム・サブテルミネール(*Clostridium subterminale*)  
 クロストリジウム・スポロゲネス(*Clostridium sporogenes*)

## 特開平2-154700(13)

クロストリジウム・ビフェルメンタンス(*Clostridium bifermentans*)  
 フソバクテリウム・ヌクレアタム(*Fusobacterium nucleatum*)  
 フソバクテリウム・モルチフェラム(*Fusobacterium mortiferum*)  
 バクテロイデス・フラギリス(*Bacteroides fragilis*)

## 3. グラム陽性球菌

エンテロコッカス・ファエカリス(*Enterococcus faecalis*)  
 エンテロコッカス・ファエシウム(*Enterococcus faecium*)  
 ストレプトコッカス・ボビス(*Streptococcus bovis*)  
 ストレプトコッカス・ミレーリ(*Streptococcus milleri*)  
 スタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*)

## 4. オキシダーゼ陽性

アエロモナス・ヒドロフィラ(*Aeromonas hydrophila*)  
 プレシオモナス(*Plesiomonas*)  
 ビブリオ・コレラエ(*Vibrio cholerae*)  
 ビブリオ・アルギノリチカス(*Vibrio alginolyticus*)

## 5. 非培養

シュエドモナス・アエルギノサ(*Pseudomonas aeruginosa*)  
 シュエドモナス・フルオレッセンス(*Pseudomonas fluorescens*)  
 シュエドモナス・マルトフィリア(*Pseudomonas maltophilia*)  
 アルカリゲネス・ファエカリス(*Alcaligenes faecalis*)

アルカリゲネス・デニトリフィカンス(*Alcaligenes denitrificans*)  
 アシネトバクター(*Acinetobacter*)

## 6. プラスミド含有エシェリヒア・コリ

28TAM1 (Col VBM260)  
 CGSC 6059 (F)  
 711 (p307)  
 3272 (pGC1)  
 J53 (pGC200)  
 J53 (RP4)  
 J53 (Rsa)  
 C600 (RSF1010)

## 7. カンビロバクターコントロール

カンビロバクター・フェツス(株1)  
 カンビロバクター・ラジス(株116)  
 カンビロバクター・ラジス(株195)  
 カンビロバクター・アップサリエンシス(株170)

## 操作方法:

既に分類された115のカンビロバクター株  
 ( $10^7$ 細胞/株)をカンビロバクター用の選択  
 培地に置かれた3種のナイロン膜(アマーシム  
 のハイボンド-N)上で培養した。微好気性雰囲気  
 下42℃で16時間の培養後、膜を風乾し、  
 1N NaOH・20%EtOH緩衝液に15分  
 間、1MトリスHCl緩衝液(pH7.5)に3  
 ×10分間連続的に入れた。膜を30分間風乾し、  
 細菌のDNAをUV光(312nm)により膜に固  
 定した。次いで、膜を粉乳1% (ネスルのグロ  
 リア)、SDS0.1%及び子牛胸腺由来変性  
 DNA(サーバ)20μg/ml含有2×SSC中  
 60℃で1時間前ハイブリッド形成させた。次い  
 で、各膜を3種のプローブOCC267a、  
 OCC267b又はOCJ1511a  $10^6$   
 dpn/mlの1つを含有した同一組成の緩衝液中で  
 ハイブリッド形成させた。プローブの末端標識化  
 は、ワレスの方法に従いT4キナーゼ及びγ-  
 [ $^{32}$ P]ATPを用いて行われた。60℃で16

時間インキュベート後、各膜を60℃において2  
 ×SSC・0.1%SDS緩衝液で10分間にわ  
 たり3回洗浄した。膜を風乾し、-80℃で16  
 時間にわたりオートラジオグラフィーに付した。

各プローブとカンビロバクター115株とのハ  
 イブリッド形成結果を、これらの株のrDNAの  
 XhoI・BglII RFLP分析によるこれら  
 115株の分類結果と比較した。

下記表は、試験された115株に関するプロ  
 ーブOCC267bの特異性及び感度の計算値につ  
 いて示している。

		RFLP分析により 同定されたC. コリ	
		+	-
プローブOCC267b とのハイブリッド形成	+	18	3
	-	1	93
		19	96
		115	

感度:  $18/19 \times 100 = 95\%$

特異性:  $93/96 \times 100 = 97\%$

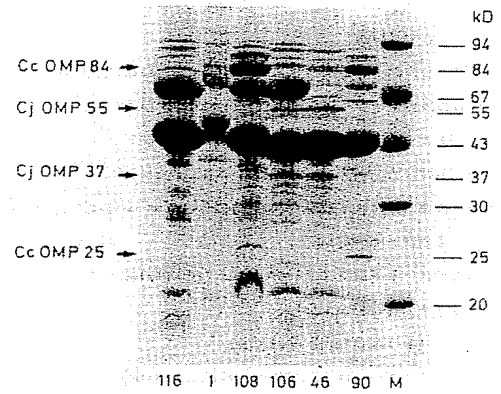
特開平2-154700(14)

## 4. 図面の簡単な説明

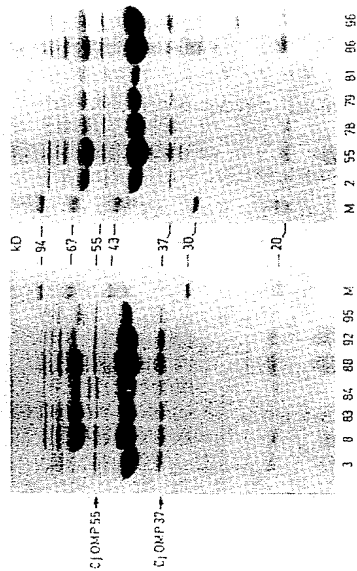
第1～3図は、カンピロバクターの外膜のタンパク質の特性に関するポリアクリルアミドゲル分析について示している写真である。

第4図は、酵素Xho I / Bgl IIで開裂されかつ16SrDNAに相補的なプローブとハイブリッド形成されたカンピロバクターのゲノムDNAの“サザンロット”による分析結果について示している写真である。

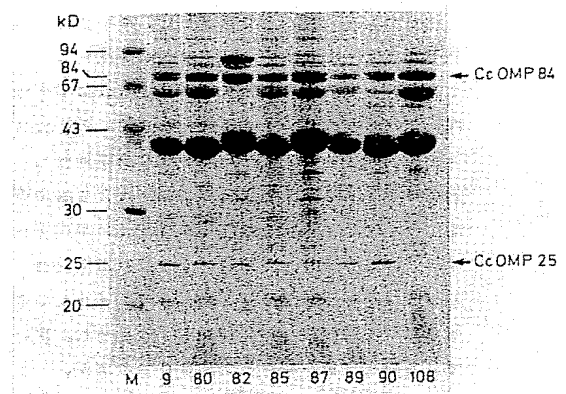
第5及び6図は、カンピロバクターのゲノムDNAのサザン分析結果について示している写真である。



第1図



第2図

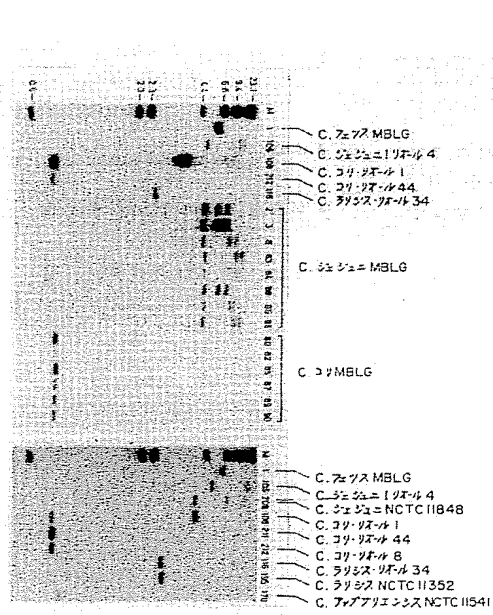


第3図

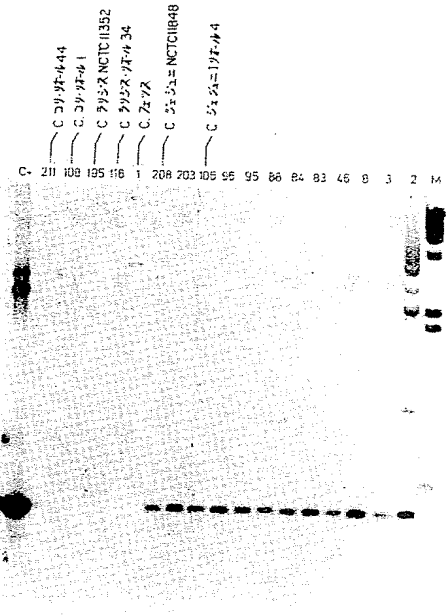


特開平2-154700 (15)

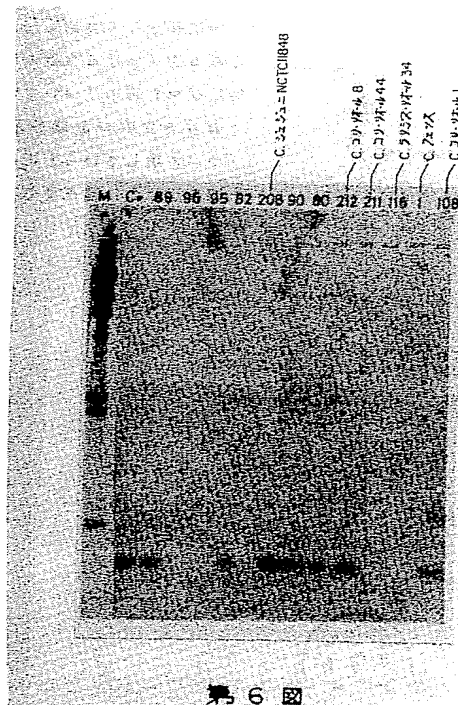
第4図



第5図



第6図



特開平2-154700 (16)

第1頁の続き

⑤Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号
// C 12 Q 1/10		6807-4B
G 01 N 33/569	F	7906-2G
33/60	A	7055-2G

⑦発明者 イザベル、デルクレ ベルギー国ブリュッセル、シヨーセ、ドウ、ラ、ウルブ、  
184 (ペーテーウ、6)

⑦発明者 イザベル、デロ ベルギー国リクザンサール、アブニユ、マルセル、ティル  
カン、5

⑦発明者 ギ、コルネリ ベルギー国クライーネム、アブニユ、デ、コンバタン、2  
ビス

## 手続補正書 (方式)

平成 1 年 11 月 20 日

特許庁長官 吉田文毅 殿

1 事件の表示

平成 1 年特許願第 173882 号

2 発明の名称

カンピロバクター属の異なる細菌種を特異的に検出するために有用な核酸プローブ

3 補正をする者

事件との関係

特許出願人

イエルエーメドジェニックス、ソシエテ、  
アノニム

4 代理人 (郵便番号 100)

東京都千代田区丸の内三丁目2番3号  
〔電話東京 (211)2321 大代表〕

6428 井理士、佐藤 一

5 補正命令の日付

発送日 平成 1 年 10 月 31 日

6 補正の対象

願書の出願人の欄、委任状及び明細書の  
「図面の簡単な説明」の欄

7 補正の内容

1 別紙の送り

2 明細書第51頁第4行に「ついで示している」とあるを「おける生物の形態を示す」に、第8行及び第9行に「ついで示している」とあるを「おける生物の形態を示す」に、第11行に「ついで示している」とあるを「おける生物の形態を示す」に補正する。

